

编制说明

一、工作简况，包括任务来源、协作单位、主要工作过程、标准起草单位及人员；

1 任务来源

人乳为婴儿提供最佳的营养和健康益处，是婴儿配方奶粉开发的金标准。乳清蛋白是动物乳中酪蛋白沉淀后仍保留在溶液中的一组球蛋白，是主要的乳蛋白之一，通过同源转移在新生哺乳动物的免疫防御中具有重要作用。在羊奶和牛奶中，乳清蛋白占总蛋白质含量的 18-22%。乳清蛋白主要由 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白、血清白蛋白、免疫球蛋白、乳铁蛋白和过氧化物酶等组成。因而在乳基婴儿配方食品中，乳清蛋白作为重要的蛋白组分，占总蛋白的比例应依照母乳调至相应比例，以使配方奶粉中蛋白质和氨基酸构成更接近于母乳。

已废止的 GB 10765-2010 食品安全国家标准 婴儿配方食品规定，乳基婴儿配方食品（一段婴儿配方乳粉）中乳清蛋白含量应 $\geq 60\%$ ，现行 GB 10765-2021 食品安全国家标准 婴儿配方食品和 GB 10766-2021 食品安全国家标准 较大婴儿配方食品两项标准中规定，乳基婴儿配方食品（适合 0-6 月婴儿的婴儿配方乳粉）中乳清蛋白含量应 $\geq 60\%$ ，乳基较大婴儿配方食品（适合 7-12 月婴儿的较大婴儿配方乳粉）中乳清蛋白含量应 $\geq 40\%$ 。这一系列标准的完善，反映出 2010 年以来，监管部门对婴儿配方食品安全与品质的重视，限定指标与国际接轨，更具科学性，也增加了企业约束力，增强了消费者信心。

但是，目前现行有效的乳清蛋白检测标准 GB/T 5413.2-1997 婴幼儿配方食品和乳粉 乳清蛋白的测定，主要将试样进行 SDS-PAGE 电泳后，用光密度计对按分子量顺序分离开的酪蛋白与乳清蛋白各谱带进行测定，求得酪蛋白乳清蛋白的含量比率，该方法通量较低，且对操作人员手法有一定要求。相比于传统的垂直板电泳技术，毛细管凝胶电泳技术同样基于 SDS-PAGE 的原理，但操作简便，自动化，易量化和标准化，近年来在食品分析领域得到越来越广泛的应用，已经出现在我国、欧洲、美国的药典以及 ISO 和 IDF 等多个标准中。

因此，为了保障婴儿配方乳粉品质，确保生产厂家及消费者的利益，有效对羊乳基婴儿配方乳粉中的乳清蛋白含量进行测定，特制定本标准。

2 主要工作过程

2022 年 11 月，查阅并收集有关技术资料及检测标准，并对相关企业及产品进行调研。在已建立的方法基础上，申报了本标准项目，制定样品收集及方法研究计划。

2023 年 1 月，中国营养保健食品协会下达了本标准项目计划。

2023年1月-10月，工作组根据标准拟定实验方案，收集样品，在已初步建立乳源成分检测方法的基础上进行参数优化及准确性和稳定性研究。

2023年11月，提交标准征求意见稿和编制说明。

2024年3月，标准中期会。

2024年4月-8月，工作组根据专家意见扩大样品采集、改进验证方案，完成标准实验、验证工作。

二、标准编制原则和确定标准主要内容

1 标准编制原则

本标准的制定主要依据国家有关法律、法规、国家标准管理办法以及 GB/T 20004.1-2016 团体标准化 第1部分：良好行为指南，GB/T 20004.2-2016 团体标准化 第2部分：良好行为评价指南、GB 19489 实验室 生物安全通用要求、GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法、GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检验等标准，并结合在制订标准中抽样检测的数据，确定了本标准的技术数据。

2 标准主要内容及适用范围

本标准规定了羊乳基婴儿配方食品和羊乳基较大婴儿配方食品中乳清蛋白含量定量检测方法。

本标准适用于羊乳基婴儿配方食品乳清蛋白含量定量检测，适用的产品类别包括未加入了植物蛋白的羊乳基婴儿配方食品、羊乳基较大婴儿配方食品等。

3 方法原理

3.1 方法定义

毛细管凝胶电泳，是指将起分子筛作用的凝胶聚合物灌注于毛细管中，以高压直流电场为驱动力的对生物大分子进行分析检测的技术。

3.2 检测原理

采用毛细管凝胶电泳法，通过 SDS 对样品中蛋白质组分进行变性和附加电荷的处理，采用毛细管电泳仪对蛋白质组分进行分离，即在乳及乳制品中的蛋白质（包括变性和非变性的蛋白质）溶液中，加入阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠（SDS）和 β -巯基乙醇。在加热的条件下，蛋白质间的分子间力和二硫键断开，SDS 结合到蛋白质分子上，形成带负电的蛋白质-SDS 复合物。该复合物进入填充了分离凝胶的电场后，在电压的驱动下迁移至检测窗口，在 214nm 被检测。依据小分子量乳清蛋白、乳酪蛋白、大分子量乳清蛋白峰面积，经过换算系数计算，测定乳清蛋白含量。

三、主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果；

1 试验结果分析

1.1 技术路线

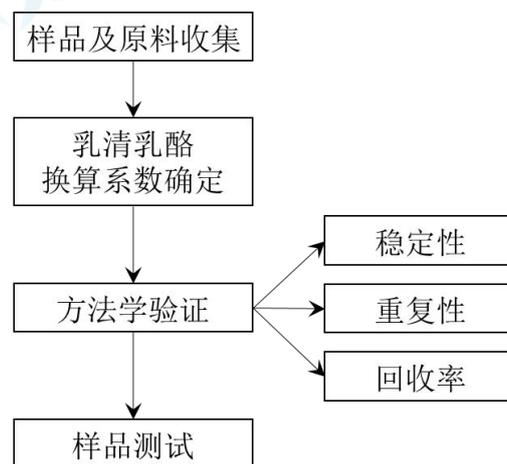


图 1 毛细管电泳检测技术路线图

1.2 羊乳婴儿配方乳粉及其蛋白原料测定

为分析羊乳婴儿配方乳粉及其蛋白原料图谱特征及差异，对一段、二段、三段的婴幼儿配方乳粉，以及其主要蛋白原料，包括真实来源的液态羊乳、羊乳清蛋白粉、羊乳酪蛋白粉、全脂羊乳粉、脱脂羊乳粉、脱盐乳清粉、浓缩乳清粉等以及羊初乳粉进行分析。典型原料及羊初乳粉结果如图 2 所示，发现婴幼儿配方食品羊乳蛋白原料中，乳清蛋白可分为小分子量乳清蛋白和大分子量乳清蛋白，与羊乳酪蛋白区域相互之间不存在重叠，理论上可以做到基线分离。并且，羊初乳样品中免疫蛋白等大分子量乳清蛋白含量高，可以佐证确定大分子量乳清蛋白与乳酪蛋白区域准确性。

对不同阶段羊乳基婴幼儿配方乳粉及相关含蛋白原料的检测，实验采用的样品均为经过热加工处理的真实样品，已考虑热加工处理、美拉德反应等对蛋白的影响。发现乳清蛋白与乳酪蛋白区域间可明显区分且均实现了基线分离，结果如图 3 所示。

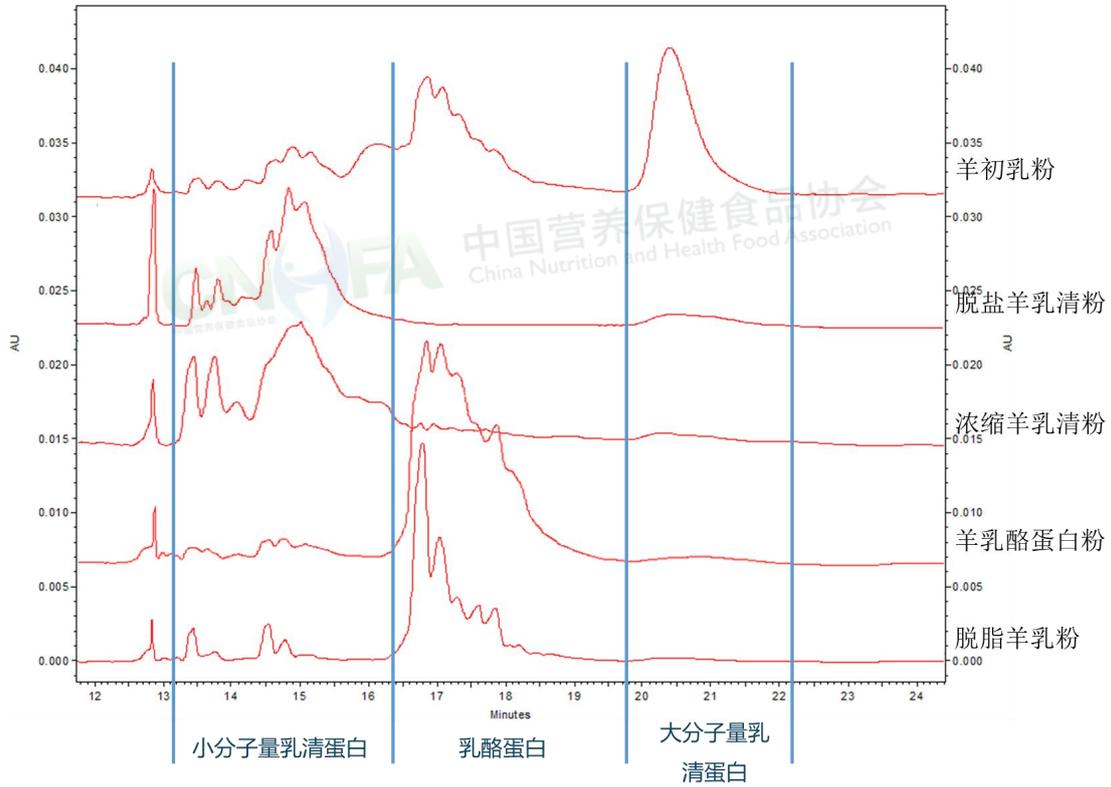


图2 羊乳婴幼儿配方乳粉典型原料及羊初乳粉毛细管凝胶电泳图谱

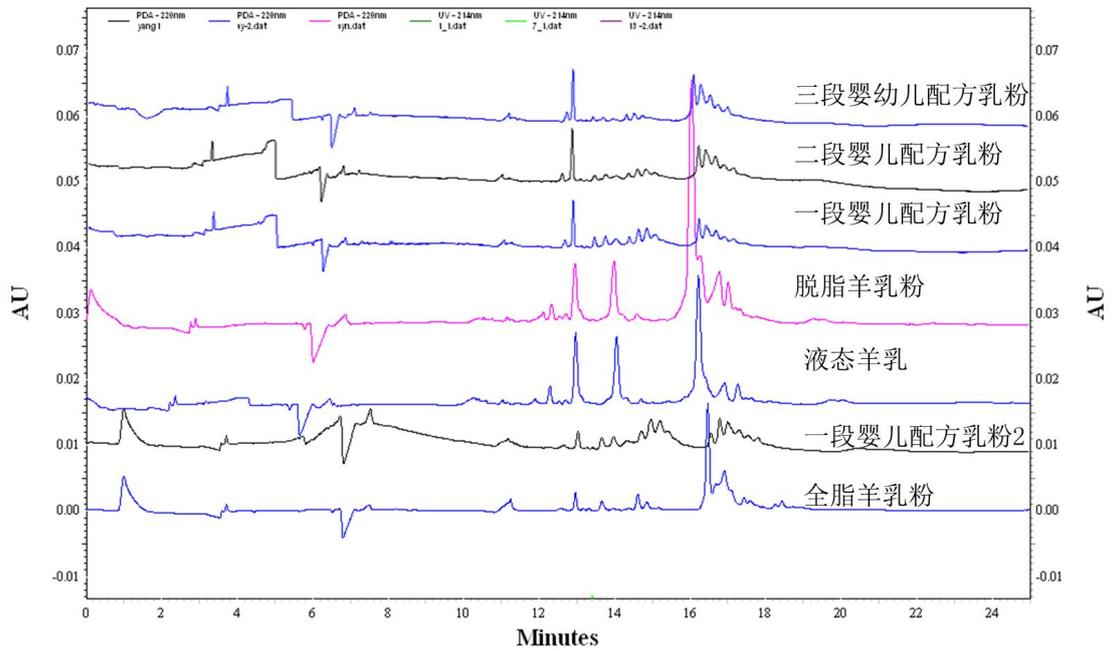


图3 羊乳婴幼儿配方乳粉及其蛋白原料毛细管凝胶电泳图谱

1.3 乳清乳酪换算系数确定

本方法采用紫外检测器，检测 214nm 处吸收信号。根据文献报道，214nm 主要为蛋白中肽键吸收峰，而多种有机物，如醇、酮、醛、醚、有机酸、酰胺类

或具有相似结构的化合物等都有该波段存在吸收。而不同蛋白因修饰等差异使得紫外吸收不一样，导致样品峰面积与实际值存在差异。因此，需要引入换算系数，校正峰面积，进行乳清蛋白含量测定。

1.3.1 线性关系测试

为对方法线性关系进行评价，采用羊乳乳清蛋白粉与羊乳酪蛋白粉进行模拟掺比实验，首先使用 BCA 蛋白定量试剂盒（德国，Merck 公司）测量两份蛋白样品溶液总蛋白浓度。所有样品（包括标准品）重复 3 次。在酶标仪上 560nm 读数，制作标准曲线，根据标准曲线计算样品总蛋白含量（mg/ml）。之后，统一两个样品的蛋白溶液至 15 mg/mL。按照体积梯度掺比，比例见表 2。随后将配制好的样品进行测试，结果如图 4-A 所示。对样品大分子量乳清蛋白、小分子量乳清蛋白、乳酪蛋白进行积分，以乳清蛋白占比为横坐标，以乳清蛋白峰面积占乳清乳酪蛋白峰面积和比例为纵坐标，绘制标准曲线，结果如图 4-B 所示，所得标准曲线方程为 $y=1.0169x+2.8508$ ，线性相关系数 R^2 为 0.9926，表明所建立的标准曲线线性关系良好。

表 1 乳清、乳酪蛋白溶液掺比比例

编号	乳清蛋白占比 (%)	羊乳清蛋白溶液体积 (15mg/mL; mL)	羊乳酪蛋白溶液体积 (15mg/mL; mL)
1	0	0	1000
2	0.5	5	995
3	1	10	990
4	2	20	980
5	5	50	950
6	10	100	900
7	20	200	800
8	50	500	500
9	80	800	200
10	90	900	100
11	100	1000	0

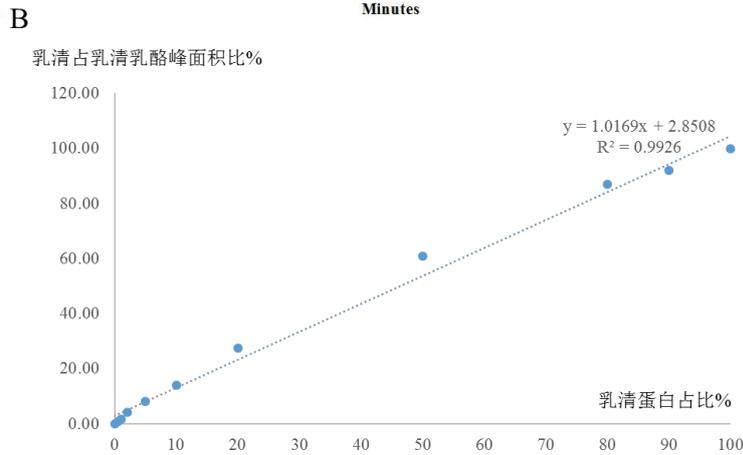
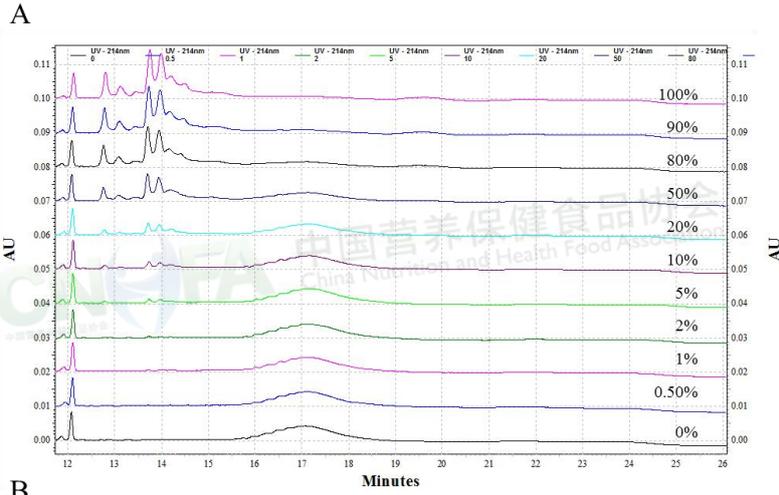


图 4 梯度产比样品测试结果

1.3.2 换算系数确定

为确定乳清乳酪蛋白换算系数，针对悦白、悠装两个系列的已知乳清蛋白含量的样品进行测试。目前备案注册时均按照添加理论值认定，因此，本方法以此为基础，与注册备案保持一致。每个样品 2 次平行，样品信息如表 3 所示。

表 3 样品信息表

	信息/编号	批次号/生产日期	样品编号	乳清蛋白理论含量
悦白 1 段	Kabrita Yuebai IF1	84462	S1	61.76%
		84463	S2	61.76%
		84464	S3	61.76%
		88839	S4	61.76%
		88840	S5	61.76%
		88841	S6	61.76%
悠装 1 段	Kabrita Youzhuang IF1	91081	S7	61.39%
		91187	S8	61.39%
		91188	S9	61.39%
		91083	S10	61.39%
		91189	S11	61.39%

		91190	S12	61.39%
悦护 1 段	1B7GI1757	20230917	S13	68.40%
悦护 1 段	1F6GG1756	20230718	S14	68.00%
悦白 2 段	Kabrita Yuebai FOF2	84468	S15	42.20%
		84469	S16	42.20%
		84470	S17	42.20%
		88845	S18	42.20%
		88846	S19	42.20%
		88847	S20	42.20%
悠装 2 段	Kabrita Youzhuang FOF2	91084	S21	42.20%
		91191	S22	42.20%
		91192	S23	42.20%
		91082	S24	42.20%
		91186	S25	42.20%
		91185	S26	42.20%
悦护 2 段	1B9GI1457	20230915	S27	61.30%
悦护 2 段	1B9G1457	20230916	S28	61.30%

用手动峰积分从酪蛋白后到乳清蛋白峰后的基线，得到乳酪蛋白后的相对分子质量高的乳清蛋白的面积。将所有乳清蛋白的峰面积加和（酪蛋白前和酪蛋白后），再将所有乳酪蛋白的峰面积加和。经计算，确定乳清蛋白峰面积与乳酪蛋白峰面积校正系数为 1.6，计算结果以平行测定值的算术平均值表示，保留四位有效数字。计算公式如下：

按照公式（1）和（2）计算乳清蛋白在婴幼儿配方奶粉中的含量：

$$A_{c.w.}=1.6\times A_w \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中： $A_{c.w.}$ - 乳清蛋白校正峰面积；

A_w - 总乳清蛋白实测峰面积

$$\text{乳清蛋白含量}(\%) = A_{c.w.}/(A_{c.w.}+A_{c.n})\times 100 \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中： $A_{c.n}$ - 总乳酪蛋白实测峰面积

样品测定结果如表 4 所示，按照公式计算乳清蛋白在婴幼儿配方奶粉中的含量，一段、二段婴儿配方乳粉检测结果与乳清蛋白理论含量结果相近，证明该方法可以作为一段、二段婴儿配方乳粉乳清蛋白含量检测方法，可以满足目前标准中对于婴儿配方食品、较大婴儿配方食品乳清蛋白含量检测需求。

表 4 样品乳清蛋白含量测定结果

样品编号	小分子乳清	乳酪蛋白	大分子乳清	总乳清蛋白	乳清蛋白校正	乳清蛋白含量
1-1	146678	135870	6219	152897	244635.2	64.29%
1-2	149644	136628	5624	155268	248428.8	64.52%
2-1	136022	128091	5406	141428	226284.8	63.85%
2-2	132845	127121	5908	138753	222004.8	63.59%
3-1	129949	116321	1977	131926	211081.6	64.47%
3-2	130563	116276	1852	132415	211864	64.57%
4-1	156015	142966	5826	161841	258945.6	64.43%
4-2	152672	136370	4932	157604	252166.4	64.90%
5-1	129752	120394	4855	134607	215371.2	64.14%
5-2	130379	120350	5758	136137	217819.2	64.41%
6-1	144239	131640	6980	151219	241950.4	64.76%
6-2	152251	137639	7578	159829	255726.4	65.01%
7-1	142328	134998	5670	147998	236796.8	63.69%
7-2	140211	132902	5798	146009	233614.4	63.74%
8-1	154324	137177	6417	160741	257185.6	65.22%
8-2	143275	129876	7373	150648	241036.8	64.98%
9-1	134938	124069	5058	139996	223993.6	64.35%
9-2	134173	124815	4496	138669	221870.4	64.00%
10-1	133679	123521	6988	140667	225067.2	64.57%
10-2	132067	122385	6678	138745	221992	64.46%
11-1	147969	136324	5282	153251	245201.6	64.27%
11-2	147754	135428	5699	153453	245524.8	64.45%
12-1	139829	128482	6226	146055	233688	64.52%
12-2	138981	126387	6789	145770	233232	64.86%

样品编号	小分子乳清	乳酪蛋白	大分子乳清	总乳清蛋白	乳清蛋白校正	乳清蛋白含量
13-1	166703	119280	21325	188028	300844.8	71.61%
13-2	168413	118342	19775	188188	301100.8	71.79%
13-3	168387	117991	20519	188906	302249.6	71.92%
13-4	168007	120450	21065	189072	302515.2	71.52%
14-1	167341	118528	19423	186764	298822.4	71.60%
14-2	169310	117365	17441	186751	298801.6	71.80%
14-3	168034	118781	16363	184397	295035.2	71.30%
15-1	91633	199970	3374	95007	152011.2	43.19%
15-2	100366	214181	2579	102945	164712	43.47%
16-1	100797	225642	4927	105724	169158.4	42.85%
16-2	99246	216910	4108	103354	165366.4	43.26%
17-1	104753	233707	2505	107258	171612.8	42.34%
17-2	111292	238515	2096	113388	181420.8	43.20%
18-1	92487	205989	3325	95812	153299.2	42.67%
18-2	99547	225655	4112	103659	165854.4	42.36%
19-1	102686	221117	1284	103970	166352	42.93%
19-2	102768	219925	606	103374	165398.4	42.92%
20-1	111180	241775	2995	114175	182680	43.04%
20-2	119874	260775	2770	122644	196230.4	42.94%
21-1	107496	234032	2820	110316	176505.6	42.99%
21-2	111636	240445	2855	114491	183185.6	43.24%
22-1	105046	231499	3803	108849	174158.4	42.93%
22-2	100737	228020	4399	105136	168217.6	42.45%
23-1	108394	236857	4009	112403	179844.8	43.16%
23-2	107343	238289	3972	111315	178104	42.77%

样品编号	小分子乳清	乳酪蛋白	大分子乳清	总乳清蛋白	乳清蛋白校正	乳清蛋白含量
24-1	109044	243537	4814	113858	182172.8	42.79%
24-2	109373	246452	3685	113058	180892.8	42.33%
25-1	109120	247987	3291	112411	179857.6	42.04%
25-2	100743	223290	2659	103402	165443.2	42.56%
26-1	109901	246283	3090	112991	180785.6	42.33%
26-2	109543	246516	4759	114302	182883.2	42.59%
27-1	135784	130544	7231	143015	228824	63.67%
27-2	138508	133722	6830	145338	232540.8	63.49%
27-3	141832	138413	6312	148144	237030.4	63.13%
27-4	146666	141707	7278	153944	246310.4	63.48%
28-1	143174	141061	7381	150555	240888	63.07%
28-2	144091	142030	6653	150744	241190.4	62.94%
28-3	139347	133772	6789	146136	233817.6	63.61%
28-4	144703	142892	7322	152025	243240	62.99%
				平均值		
				最大值		
				最小值		

1.3.3 准确度分析

结合各样品乳清蛋白理论含量及测定值，对一段、二段婴幼儿配方食品的数据进行准确度分析，结果如表4所示。一段婴幼儿配方食品的误差为1.82%~3.83%，相对误差范围为2.95%~6.24%；二段婴幼儿配方食品的误差为-0.16%~2.37%，相对误差范围为-0.39%~3.87%。

1.4 方法稳定性及重复性

1.4.1 方法稳定性

为考察所建立的毛细管电泳方法对蛋白组分分析的重复性，选取1份羊乳婴儿配方乳粉，图谱如图5所示。按照标准操作程序进行处理，单次试验连续进样6次，表5是6次进样的每个蛋白峰的迁移时间和相对标准偏差，14个主要蛋白峰的迁移时间相对标准偏差均低于0.4%。表6为乳清蛋白、乳酪蛋白峰面积统计。结果显示相对标准偏差为0.32%。

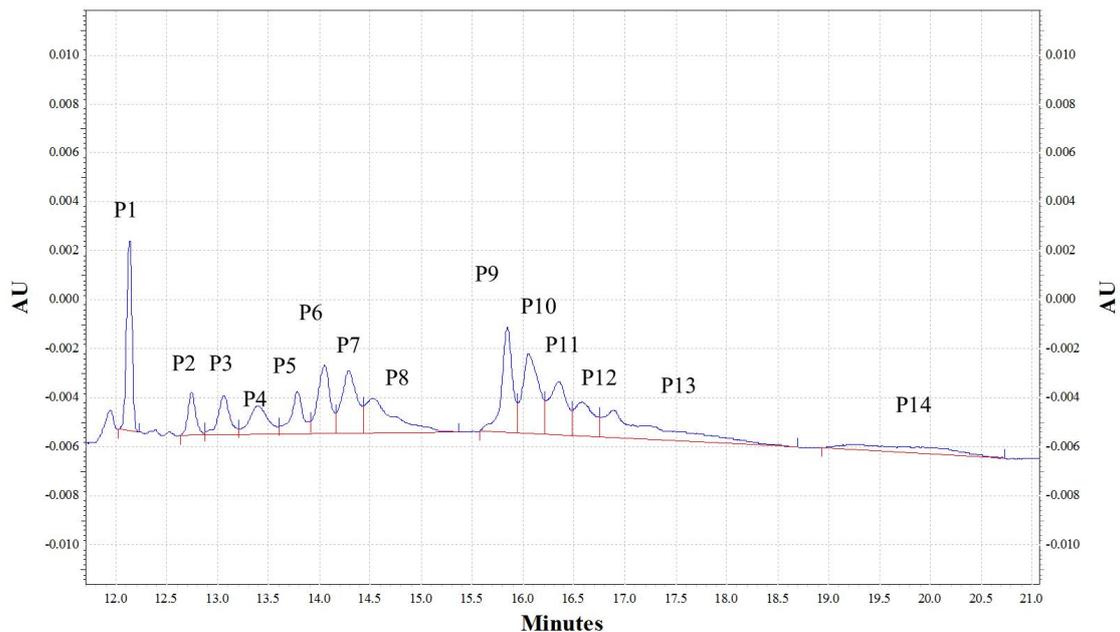


图5 羊乳婴儿配方乳粉蛋白毛细管电泳图谱

表5 6次连续进样的每个蛋白峰的迁移时间

样品	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14
1	12.146	12.758	13.075	13.421	13.8	14.067	14.304	14.55	15.867	16.075	16.371	16.604	16.908	19.238
2	12.125	12.738	13.054	13.383	13.775	14.042	14.279	14.512	15.838	16.046	16.346	16.567	16.883	19.192
3	12.15	12.758	13.079	13.413	13.804	14.071	14.308	14.546	15.867	16.079	16.371	16.608	16.913	19.171
4	12.183	12.702	13.108	13.45	13.838	14.104	14.342	14.571	15.904	16.113	16.404	16.646	16.95	19.296
5	12.2	12.804	13.125	13.467	13.858	14.125	14.367	14.6	15.933	16.142	16.442	16.671	16.992	19.189
6	12.233	12.842	13.163	13.488	13.892	14.158	14.4	14.633	15.971	16.183	16.483	16.717	17.029	19.296
RSD	0.33%	0.39%	0.30%	0.29%	0.31%	0.30%	0.31%	0.29%	0.31%	0.31%	0.31%	0.32%	0.33%	0.29%

表 6 6 次连续进样乳清蛋白含量测定结果

编号	小分子乳清	乳酪蛋白	大分子乳清	总乳清蛋白	乳清蛋白校正	乳清蛋白含量
1	137345	131970	8767	146112	233779.2	63.92%
2	132370	124078	6498	138868	222188.8	64.17%
3	120494	117970	8157	128651	205841.6	63.57%
4	130207	125070	8813	139020	222432	64.01%
5	129958	124712	7369	137327	219723.2	63.79%
6	136736	131391	8871	145607	232971.2	63.94%
RSD						0.32%

1.4.2 方法重复性

将蛋白按照标准操作程序进行处理, 选取 1 份羊乳婴儿配方乳粉, 进行 6 次独立试验, 图谱如图 3 所示。表 7 是 6 次进样的每个蛋白峰的迁移时间和相对标准偏差。表 8 为 6 次独立重复实验的每个蛋白峰的迁移时间, 14 个主要蛋白峰的迁移时间相对标准偏差均低于 1.9%。表 8 为乳清蛋白、乳酪蛋白峰面积统计。结果显示相对标准偏差为 0.64%。

表 7 6 次独立重复实验的每个蛋白峰的迁移时间

样品	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14
1	12.396	13.067	13.387	13.704	14.075	14.342	14.583	14.829	16.163	16.379	16.671	16.913	17.196	19.583
2	12.442	13.117	13.442	13.75	14.125	14.392	14.633	14.875	16.217	16.438	16.733	16.975	17.254	19.767
3	12.771	13.438	13.779	14.096	14.512	14.796	15.05	15.308	16.667	16.887	17.192	17.45	17.75	20.192
4	12.379	13.058	13.379	13.696	14.067	14.338	14.579	14.833	16.175	16.396	16.688	16.933	17.217	19.725
5	12.908	13.596	13.946	14.262	14.671	14.954	15.225	15.496	16.85	17.079	17.383	17.629	17.921	20.471
6	12.563	13.254	13.583	13.883	14.262	14.529	14.775	15.021	16.371	16.587	16.887	17.129	17.425	19.808
RSD	1.73%	1.66%	1.71%	1.68%	1.77%	1.78%	1.83%	1.86%	1.76%	1.75%	1.75%	1.75%	1.75%	1.69%

表 8 6 次独立重复实验乳清蛋白含量测定结果

编号	小分子乳清	乳酪蛋白	大分子乳清	总乳清蛋白	乳清蛋白校正	乳清蛋白含量
1	142517	130825	3531	146048	233676.8	64.11%
2	142328	137764	5670	147998	236796.8	63.22%
3	147110	137793	3710	150820	241312	63.65%
4	146447	138238	4396	150843	241348.8	63.58%
5	144541	140275	5196	149737	239579.2	63.07%
6	147969	137996	5282	153251	245201.6	63.99%
RSD						0.64%

1.5 市售样品测试

我们从市场上购买了市售来自 12 个厂家的 13 个品牌样品, 共计 40 个羊乳婴幼儿配方乳粉样品 (样品编号 SS1-SS40), 按照建立的方法进行毛细管电泳检测, 该 40 份羊乳基婴幼儿配方乳粉样品乳清蛋白含量结果如表 9 所示, 一段样品除 SS38、二段样品除 SS23 和 SS39 外, 均满足现行国家标准要求。

表 9 市售样品乳清蛋白含量测定结果

编号	标称信息	小分子乳清	乳酪蛋白	大分子乳清	总乳清蛋白	乳清蛋白校正	乳清蛋白含量
----	------	-------	------	-------	-------	--------	--------

SS-1	1 段	443891	342060.5	45187.5	489078.5	782525.6	69.58%
SS-2	2 段	352683	692026	33585.5	386268.5	618029.6	47.18%
SS-3	3 段	392633.5	777548	32865.5	425499	680798.4	46.70%
SS-4	1 段	419184.5	451128.0	38290.5	457475.0	731960.0	61.88%
SS-5	2 段	338197.5	919718.5	53034	391231.5	625970.4	40.50%
SS-6	3 段	329812.5	954616.5	40968	370780.5	593248.8	38.33%
SS-7	1 段	317385.5	364256.5	31907	349292.5	558868	60.54%
SS-8	2 段	319351.5	876084	47614.5	366966	587145.6	40.13%
SS-9	3 段	161994	628955.5	33715.5	195709.5	313135.2	33.24%
SS-10	1 段	208598.5	138524.5	36168.5	244767	391627.2	73.87%
SS-11	2 段	215431	606858	41911.5	257342.5	411748	40.42%
SS-12	3 段	94404	197596	10353.5	104757.5	167612	45.90%
SS-13	1 段	429385.5	329206.5	42898.5	472284	755654.4	69.66%
SS-14	2 段	318886	356425.5	32690.5	351576.5	562522.4	61.21%
SS-15	3 段	321219.5	426889.5	37297	358516.5	573626.4	57.33%
SS-16	1 段	378767.5	292444.5	51289.5	430057	688091.2	70.17%
SS-17	2 段	462644	491762.5	57317	519961	831937.6	62.85%
SS-18	3 段	449230	452954.5	59213	508443	813508.8	64.24%
SS-19	1 段	372135	307816	47146.5	419281.5	670850.4	68.55%
SS-20	2 段	416509	635361.5	71700	488209	781134.4	55.15%
SS-21	3 段	371645	672383	50576	422221	675553.6	50.12%
SS-22	1 段	320644.5	327909	41827.5	362472	579955.2	63.88%
SS-23	2 段	221096.5	1221440	60453.5	281550	450480	26.94%
SS-24	3 段	167701	1136661	21952	189653	303444.8	21.06%
SS-25	4 段	207091	1395235	24888.5	231979.5	371167.2	21.01%
SS-26	1 段	381464.5	347473.5	54955	436419.5	698271.2	66.77%
SS-27	2 段	372197.5	617126	48897.5	421095	673752	52.19%
SS-28	3 段	395759.5	772790.5	69017	464776.5	743642.4	49.04%
SS-29	1 段	493265	352256	83531.5	576796.5	922874.4	72.37%
SS-30	2 段	680350	417905	130397	810747	1297195	75.63%
SS-31	3 段	683060	427549.5	105224	788284	1261254	74.68%
SS-32	1 段	361725.5	347375.5	59436	421161.5	673858.4	65.98%
SS-33	2 段	361327.5	760731.5	61488.5	422816	676505.6	47.07%
SS-34	3 段	382450.5	841583.5	66121.5	448572	717715.2	46.03%
SS-35	1 段	357956	360885	42153.5	400109.5	640175.2	63.95%
SS-36	2 段	342176.5	541604.5	48304.5	390481	624769.6	53.55%
SS-37	3 段	323548	668685.5	37609	361157	577851.2	46.35%
SS-38	1 段	312200	418897.5	37977	350177	560283.2	57.21%
SS-39	2 段	281811.5	851184.5	50385.5	332197	531515.2	38.44%
SS-40	3 段	350157.5	1113770	48453	398610.5	637776.8	36.41%

1.7 结论

本方法可对乳清蛋白组分与乳酪蛋白组分可以完整分离，互不干扰，通过对乳源成分检测的灵敏度、准确性等指标的分析，本标准建立的羊乳基婴儿配方食品乳清蛋白含量毛细管凝胶电泳定性检测方法，筛选到牛乳特征性酪蛋白峰，方法特异性、精密度、线性关系以及重现性良好，满足方法学要求。

2 验证结果分析

为提高团体标准的科学性、严谨性和适用性，进一步提升标准质量，工作组委托两家毛细管电泳仪使用开展验证工作，其中一家为国产设备。

2.1 验证方案

2.1.1 测试方法

依照《羊乳婴幼儿配方食品乳清蛋白含量检测》标准草案进行测试。

2.1.2 测试项目

(1) 稳定性：日内稳定性：使用 S27 样品进行测试，连续进样 6 针；日间稳定性，使用 S27 样品进行测试，连续 3 天对样品进行独立重复试验，平行测试 2 针。

(2) 样品测试：对样品进行测试，平行测试 2 针。

2.2 北京大学化学与分子工程学院方法学验证结果

2.2.1 质控样品测试

采用工作组寄送的脱脂羊乳粉样品作为质控样品进行测试，结果如图 8 所示，图谱峰形与标准中质控样品图谱一致，小分子量乳清蛋白、乳酪蛋白、大分子量乳清蛋白可实现基线分离。

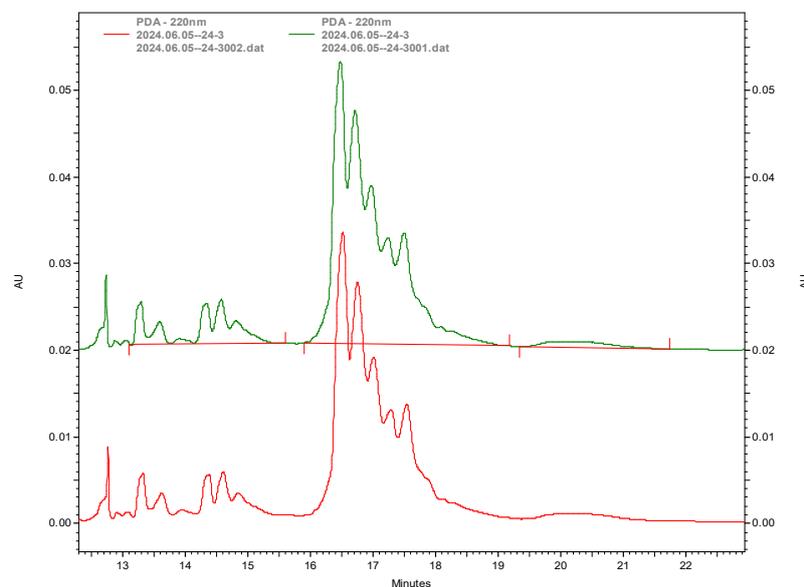


图 8 质控样品图谱

2.2.2 方法稳定性

为考察所建立的毛细管电泳方法对蛋白组分分析的重复性，选取 S27 羊乳婴幼儿配方乳粉，图谱如图 9 所示。按照标准操作程序进行处理，单次试验连续进样

6次,表12为乳清蛋白、乳酪蛋白峰面积统计。结果显示相对标准偏差为1.94%。

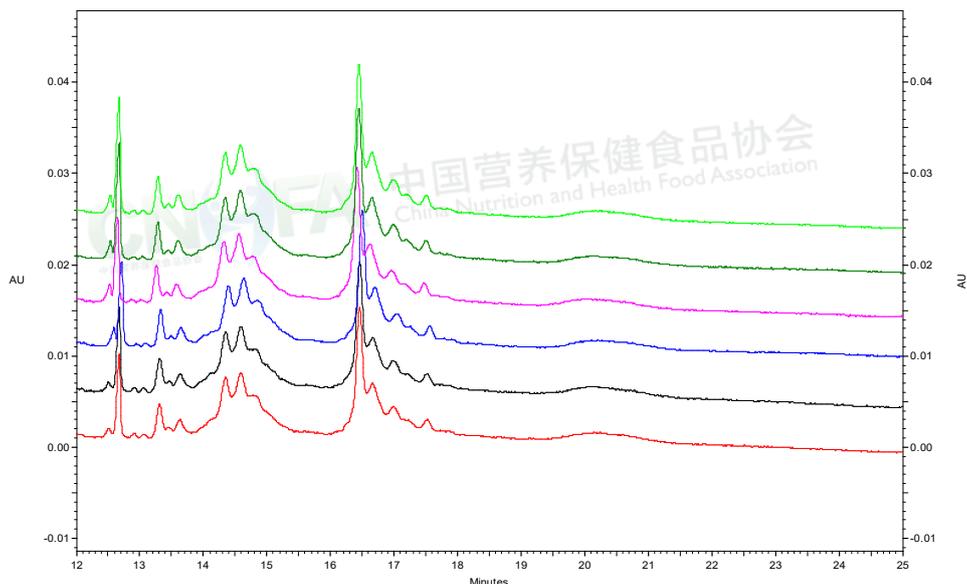


图9 方法稳定性测试图谱

表12 6次连续进样乳清蛋白含量测定结果

样品重复	小分子量乳清蛋白峰面积	乳酪蛋白峰面积	大分子量乳清蛋白峰面积	总乳清蛋白	乳清蛋白校正	乳清蛋白含量
Rep1	358304	347600	53186	411490	658384	65.45%
Rep2	340193	336355	50889	391082	625731.2	65.04%
Rep3	339820	346712	56104	395924	633478.4	64.63%
Rep4	323589	355130	59492	383081	612929.6	63.32%
Rep5	319616	356447	62898	382514	612022.4	63.19%
Rep6	356205	336009	59656	415861	665377.6	66.45%
平均值	339621	346376	54990			64.68%
RSD值	4.71%	2.54%	8.16%			1.94%

2.2.3 方法重复性

将蛋白按照标准操作程序进行处理,选取S27羊乳婴儿配方乳粉,进行6次独立试验。表13为乳清蛋白、乳酪蛋白峰面积统计,结果显示相对标准偏差为1.42%。

表13 6次独立重复实验乳清蛋白含量测定结果

样品重复	小分子量乳清蛋白峰面积	乳酪蛋白峰面积	大分子量乳清蛋白峰面积	总乳清蛋白	乳清蛋白校正	乳清蛋白含量
Rep1	358304	347600	53186	411490	658384	65.45%
Rep2	340193	336355	50889	391082	625731.2	65.04%
Rep3	321567	317715	67453	389020	622432	66.21%
Rep4	317377	305631	68543	385920	617472	66.89%
Rep5	324115	325577	67578	391693	626708.8	65.81%
Rep6	308638	333221	65181	373819	598110.4	64.22%
平均值	328366	327683	62138			65.60%
RSD值	5.47%	4.51%	12.77%			1.42%

2.3 北京职业技术学院方法学验证结果

2.3.1 质控样品测试

采用工作组寄送的脱脂羊乳粉样品作为质控样品进行测试，结果如图 6 所示，图谱峰形与标准中质控样品图谱一致，小分子量乳清蛋白、乳酪蛋白、大分子量乳清蛋白可实现基线分离。

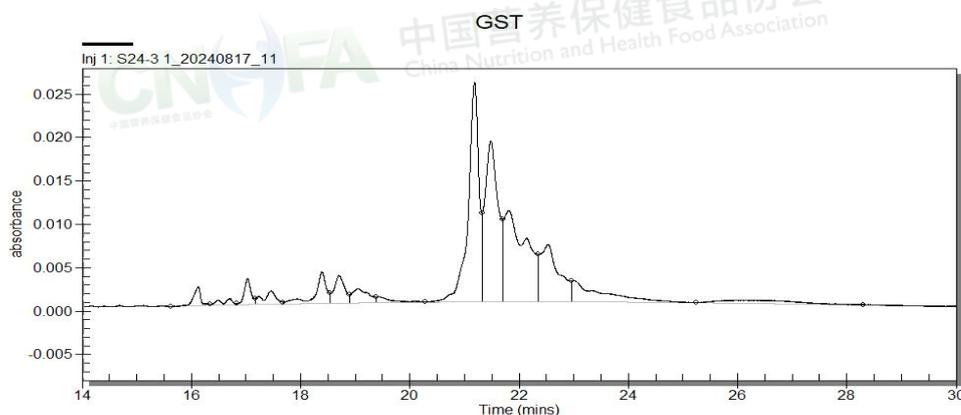


图 6 质控样品图谱

2.3.2 方法稳定性

为考察所建立的毛细管电泳方法对蛋白组分分析的重复性，选取 S27 羊乳婴儿配方乳粉，图谱如图 7 所示。按照标准操作程序进行处理，单次试验连续进样 6 次，表 10 为乳清蛋白、乳酪蛋白峰面积统计。结果显示相对标准偏差为 0.64%。

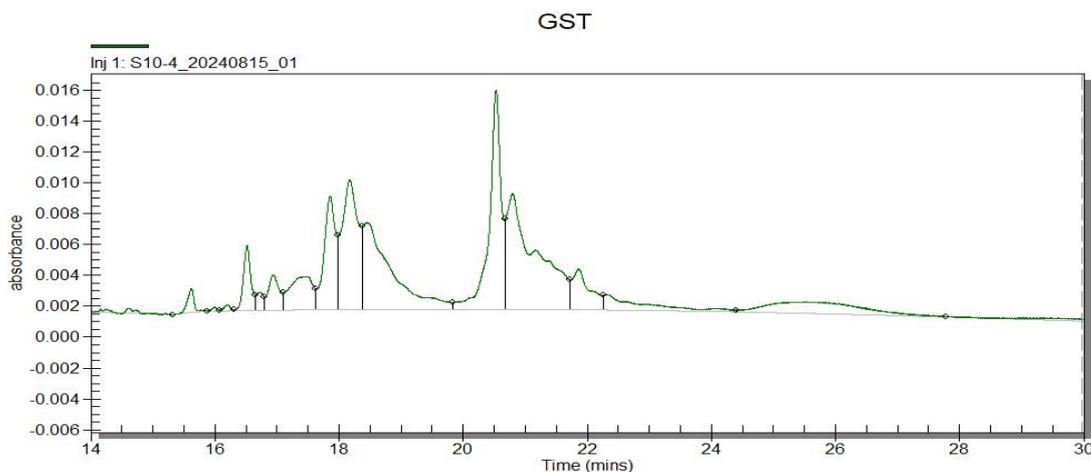


图 7 方法稳定性测试图谱

表 10 6 次连续进样乳清蛋白含量测定结果

编号	小分子量乳清蛋白峰面积	乳酪蛋白峰面积	大分子量乳清蛋白峰面积	总乳清蛋白峰面积	乳清蛋白校正峰面积	乳清蛋白含量 (%)
1	5.714	5.366	0.808	6.522	10.436	66.04
2	4.593	4.053	0.411	5.004	8.006	66.39
3	6.017	5.632	0.757	6.774	10.838	65.81
4	4.787	4.54	0.707	5.494	8.79	65.94
5	5.801	5.63	0.808	6.609	10.574	65.26
6	4.348	4.241	0.659	5.007	8.011	65.38
平均值						65.80
RSD 值						0.64%

2.3.3 方法重复性

将蛋白按照标准操作程序进行处理，选取 S27 羊乳婴儿配方乳粉，进行 6 次独立试验。表 11 为乳清蛋白、乳酪蛋白峰面积统计，结果显示相对标准偏差为 0.73%。

表 11 6 次独立重复实验乳清蛋白含量测定结果

编号	小分子量乳清蛋白峰面积	乳酪蛋白峰面积	大分子量乳清蛋白峰面积	总乳清蛋白峰面积	乳清蛋白校正峰面积	乳清蛋白含量 (%)
1	5.465	4.911	0.411	5.876	9.402	65.69
2	4.288	4.069	0.495	4.783	7.652	65.28
3	4.593	4.053	0.411	5.004	8.006	66.39
4	6.017	5.632	0.757	6.774	10.838	65.81
5	4.584	4.140	0.550	5.134	8.214	66.49
6	4.865	4.418	0.578	5.443	8.708	66.34
平均值						66.00
RSD 值						0.73%

2.4 验证测试样品结果分析

为比较验证试验结果，将工作组与验证实验室测试结果进行分析，采用已知理论值的样品进行准确度分析，一段婴幼儿配方食品的相对误差范围为 2.40%~6.98%；二段婴幼儿配方食品的相对误差范围为-5.43%~5.62%。市售样品测试结果分析表明，一段婴幼儿配方食品的 RSD 范围为 1.42%~4.79%；二段婴幼儿配方食品的 RSD 范围为 1.30%~5.45%。具体结果如表 14 所示，表明该方法准确可靠，精密度高。

表 14 验证试验测试样品结果分析

样品编号	标称	理论值	中国检验检疫科学研究院	北京大学化学与分子工程学院	北京职业技术学院	相对误差			平均值	RSD
						中国检验检疫科学研究院	北京大学化学与分子工程学院	北京职业技术学院		
YZ-01	一段	68.00%	71.18%	72.34%	69.64%	4.68%	6.38%	2.40%	71.05%	1.91%
YZ-02	一段	61.76%	64.40%	64.11%	66.08%	4.27%	3.80%	6.98%	64.86%	1.63%
YZ-03	二段	42.20%	42.69%	39.91%	40.89%	1.16%	-5.43%	-3.12%	41.16%	3.43%
YZ-04	二段	42.20%	42.97%	44.58%	44.50%	1.81%	5.62%	5.43%	44.01%	2.06%
YZ-05	一段	68.40%	72.23%	72.91%	69.85%	5.60%	6.59%	2.12%	71.66%	2.24%
YZ-06	一段	-	64.28%	67.87%	68.23%	-	-	-	66.79%	3.27%
YZ-07	二段	-	64.35%	71.43%	66.22%	-	-	-	67.33%	5.45%
YZ-08	二段	-	65.10%	68.88%	66.36%	-	-	-	66.78%	2.88%
YZ-09	二段	-	67.99%	68.98%	65.89%	-	-	-	67.62%	2.34%
YZ-10	一段	-	49.04%	45.90%	50.43%	-	-	-	48.46%	4.79%
YZ-11	二段	-	26.94%	27.27%	29.90%	-	-	-	28.04%	5.79%
YZ-12	二段	-	47.18%	48.02%	48.39%	-	-	-	47.86%	1.30%
YZ-13	二段	-	46.70%	47.19%	48.96%	-	-	-	47.62%	2.49%
YZ-14	二段	-	69.66%	67.73%	68.44%	-	-	-	68.61%	1.42%
YZ-15	三段	-	21.06%	22.54%	25.49%	-	-	-	23.03%	9.79%
YZ-16	二段	-	61.88%	62.51%	60.73%	-	-	-	61.71%	1.46%

3 技术经济论证

毛细管凝胶电泳技术基于 SDS-PAGE 的原理，但操作简便，自动化，易量化和标准化，近年来在食品分析领域得到越来越广泛的应用，已经出现在我国、欧洲、美国的药典以及 ISO 和 IDF 等多个标准中。如 ISO 17129-2006/FDA 206《奶粉·在十二烷基磺酸钠(SDS-CE)中使用毛细管电泳法测定大豆和豌豆的蛋白质含量》中，利用 SDS-CE 法对乳粉中的大豆和豌豆蛋白质进行分析，可以在电泳图上明确观察电泳峰，是现行区分乳粉中的动物源性蛋白和植物性蛋白质的方法，这促进了 SDS-CE 在乳粉的真伪鉴别方面的应用。

2016 年，SPIFAN/AOAC 批准了《十二烷基磺酸钠—毛细管凝胶电泳法检测婴幼儿配方粉中乳清蛋白在总蛋白中百分含量》方法为“First Action”方法。并于 2018 年，AOAC International 正式批准该方法为最终方法（AOAC 官方方法），次年 ISO 也在讨论接受该方法为标准方法。

本标准为相对定量法，不需标准品绝对定量或定位，标准附录提供质控样品图谱，可直接比对定位。相对定量法已经被广泛应用于国内外标准，如 GB/T5413.2-1997、GB/T 26636-2011、Ph Eur 1352 Omega-3-acid triglycerides、AOAC Official Method 2016.15 等。

我国现行实施的 GB 10765-2021 食品安全国家标准 婴儿配方食品和 GB 10766-2021 食品安全国家标准 较大婴儿配方食品两项标准中规定，乳基婴儿配方食品（适合 0-6 月婴儿的婴儿配方乳粉）中乳清蛋白含量应 $\geq 60\%$ ，乳基较大婴儿配方食品（适合 7-12 月婴儿的较大婴儿配方乳粉）中乳清蛋白含量应 $\geq 40\%$ 。但目前主要的计量方法是按照原料添加量计算，没有合适的标准方法来测量在婴幼儿配方乳粉中的乳清蛋白含量。项目申请单位及合作单位已开展基于毛细管凝胶电泳的羊乳基婴幼儿配方乳粉乳清蛋白含量测定研究，由于羊乳中乳清蛋白和乳酪蛋白出峰时间存在差异，经系数换算，可以实现对羊乳基婴儿配方粉中乳清蛋白含量的高效、高准确性测定，可实现标准化。该方法标准研制将与现有 ISO 和 AOAC 标准出于同一技术水平。

4 预期经济效果

现行 GB 10765-2010 食品安全国家标准 婴儿配方食品规定，乳基婴儿配方食品（一段婴儿配方乳粉）中乳清蛋白含量应 $\geq 60\%$ ，即将实施的 GB 10765-2021 食品安全国家标准 婴儿配方食品和 GB 10766-2021 食品安全国家标准 较大婴儿配方食品两项标准中规定，乳基婴儿配方食品（适合 0-6 月婴儿的婴儿配方乳粉）中乳清蛋白含量应 $\geq 60\%$ ，乳基较大婴儿配方食品（适合 7-12 月婴儿的较大婴儿配方乳粉）中乳清蛋白含量应 $\geq 40\%$ 。但目前主要的计量方法是按照原料添加量计算，没有合适的标准方法来测量在婴幼儿配方乳粉中的乳清蛋白含量。本标

准方法的建立对于加强质量监管、打击假冒伪劣产品，对保障消费者身体健康和生命安全，维护企业、牧民和消费者的合法权益，促进乳品产业健康稳定发展具有良好的社会效益和经济效益。

四、采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际同类标准水平的对比情况

现有的针对乳制品中乳清蛋白相关的检测的标准有：

ISO 23293:2020 Milk-based infant formula powders- Quantification of whey protein content by sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis (SDS-CGE)

该标准由 ISO/TC 34 食品技术委员会、SC 5 乳和乳制品分委员会以及国际乳业联合会(IDF)与 AOAC INTERNATIONAL 合作编写。由 ISO 和 IDF 联合出版, AOAC INTERNATIONAL 单独出版。检测方法等同于 AOAC 官方方法 AOAC 2016.15: 《通过十二烷基硫酸钠-毛细管凝胶电泳(SDS-CGE)对乳基婴儿配方奶粉中的乳清蛋白含量进行定量, 2016 年第一版, 2018 年最终版》。采用毛细管凝胶电泳法对牛乳基婴儿配粉中的乳清蛋白含量进行检测, 在乳清与酪蛋白的比例在 20: 80 到 80: 20 范围内准确性高, 可操作性强。但该方法适用范围为牛乳基婴儿配粉中乳清与酪蛋白的比例检测, 并未针对羊乳基婴儿配粉进行检测。

目前文献报道的有关乳制品中乳清蛋白含量检测的方法包括毛细管电泳技术、高效液相色谱法、凝胶色谱分析技术等。

以上标准或方法应用范围不同, 各有优缺点。高效液相色谱法回收率和精密度正常, 重现性好, 操作简便, 但样品前处理操作较为繁琐, 成本较高; 凝胶色谱分析技术方法稳定, 准确性高, 成本低, 操作简便, 但可能存在适用范围的局限性, 对于羊乳清蛋白的分离和检测效果不确定性较大。

毛细管电泳技术在牛乳清蛋白检测中有较好运用, 但并未针对羊乳清蛋白定量检测制定标准。

五、与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系;

本标准与现行法律、法规、规章和政策以及有关基础和强制性标准不矛盾。

六、重大分歧意见的处理经过和依据;

本标准未产生重大分歧意见。

七、作为强制性标准或推荐性标准的建议;

本标准可作为推荐性标准。

八、贯彻标准的要求和措施建议(包括组织措施、技术措施、过渡办法、实施日期等内容);

本标准为首次发布。

九、其他需要说明的事项。

无其他需要说明的事项。

